

# Kontrastoptimierte Einstellung des Interferenzkontrastes Pol Int nach Jamin-Lebedeff (CARL ZEISS, Oberkochen)

## Der Interferenzkontrast Pol Int nach Jamin-Lebedeff (CARL ZEISS, Oberkochen)

Mit einem konventionellen Polarisationsmikroskop (Polarisator, Kondensor Pol, Drehtisch 360°, Objektiv Pol, Analysator) kann man bei geeigneter Orientierung des Objekts in der Probe qualitativ zunächst die Doppelbrechung (Anisotropie) als solche nachweisen (Objekt wird bei Tischdrehung um 360° viermal hell und dunkel). Weiterhin lässt sich die Richtung der langsamen Schwingungsrichtung  $n_y$  im Objekt bestimmen (optischer Charakter in Bezug auf eine Formvorzugsrichtung, z.B. Objekt-Längsachse). Dies erfolgt zumeist im orthoskopischen Strahlengang, mittels Lambda-Platte (Beobachtung Blaufärbung des Objekts) oder in der Konoskopie mit Lambda/4-Platte (Lage der jetzt dunkel erscheinenden Zentren in den Melatopen/ Isogyren des Achsenbildes). Mit einem geeigneten Kompensator kann dann noch quantitativ die Stärke der Doppelbrechung bestimmt werden. Das geschieht indirekt, durch Messung des Gangunterschiedes zwischen dem ordentlichen und außerordentlichen Strahl in der anisotropen Objektstruktur. Kennt man die Objektdicke, lässt sich hieraus die Stärke der Doppelbrechung ableiten. Ist die Doppelbrechung als Materialeigenschaft bekannt, ist es einfach und mit guter Genauigkeit möglich, die Objektdicke zu bestimmen.

Die Bestimmung von Gangunterschieden **zwischen** Objekt und dem es umgebenden Medium ist mit einem konventionellen Polarisationsmikroskop jedoch nicht möglich.

Das Interferenzmikroskop nach Jamin- Lebedeff Pol Int ist ein modifiziertes Polarisationsmikroskop. Es wurde bereits 1886 von Jamin und 1935 von Lebedeff beschrieben. Eine brauchbare Einrichtung, die auch optisch höchsten Ansprüchen an die Bildqualität genügt, wurde jedoch erst durch verbindende Fertigungstechnologien zwischen Kristalloptik und Objektivbau möglich. Diese Arbeiten wurden im Wesentlichen von Prof. Piller, Dr. Gahm (CZO) und Dr. Johannes Flügge (CZG) vorangetrieben.

Andere, ähnlich aufgebaute Einrichtungen aus der Zeit waren dem Pol Int in der Bildgüte daher deutlich unterlegen (z.B. Interference Contrast nach Baker CTS, York).

E. LEITZ (Wetzlar) hat später auch eine nach dem Jamin- Lebedeff Prinzip herausgebrachte Einrichtung gebaut, die aber aufgrund des dort gewählten mechanischen Lösungsweges (z.B. Bautenzüge für den Kondensorprismen-Wechsel) ein reines Einzweck-Instrument blieb. Modifikationsversuche an dieser Einrichtung führten in der Regel zur Beschädigung. Das Interphako- Verfahren nach Beyer und Schöppe ist „Nebenbestandteil“ eines ebenfalls recht komplexen und sehr leistungsfähigen Einzweck- Messinstrumentes zur sehr genauen Ermittlung von Gangunterschieden. Es entstehen im Gegensatz zur Einrichtung Pol Int hier keine störenden Geisterbilder. Das Interphako- Verfahren (CARL ZEISS, Jena) ist jedoch wesentlich lichtscluckender/ staubanfälliger und liefert als reine Kontrastierungsmethode

- im Gegensatz zur landläufigen Meinung- keinesfalls eine bessere Bildqualität als die einfacher aufgebaute Pol Int- Einrichtung. Weniger Glas ist hier mehr Kontrast!

Der Pol Int ermöglicht es, im Durchlicht in Verbindung mit Messkompensatoren (z.B. de Senarmont, Brace-Köhler), Gangunterschiede zwischen transparenten Objekten (isotrop oder anisotrop) und dem sie umgebenden Medium mit hoher Genauigkeit zu bestimmen. Dies erlaubt die Bestimmung z.B. des Trockenmasse-Gehalts von Zellen oder Zellbestandteilen (z.B. Zellkernen). Daraus kann man wiederum den Ploidie-Grad von Zellkernen ableiten, was in der Tumor-Diagnostik von Bedeutung war. Andere geeignete, transparente Objekte sind Textilfasern oder Kunststofffolien.

## **Die CZO- Bedienungsanleitung**

Der Interferenzkontrast nach Jamin- Lebedeff Pol Int wurde als rein quantitatives Verfahren zur Messung von Gangunterschieden an transparenten Objekten im Durchlicht entwickelt und nicht als Kontrastierungsverfahren für dickere Phasenobjekte, z.B. in der Zellbiologie, angesehen. Daraus ergibt sich der in der Gebrauchsanleitung gewählte Justierweg zur Erzielung eines für Messzwecke optimalen Durchlicht-Interferenzkontrastbildes nach Jamin-Lebedeff.

Die Beschreibung der Justierung dieser Einrichtung stammt von Prof. Horst Piller und Dr. Josef Gahm (beide CZO). Es muss betont werden, dass mit der in der Gebrauchsanleitung G 41-540-d/ -e beschriebenen Justierung ein für die eigentlichen Messzwecke -und das war der bestimmungsgemäße Gebrauch dieser Einrichtung – optimaler optischer Zustand erreicht wurde. Dies auch insbesondere im Hinblick auf die Messung des Gangunterschiedes mit den dafür üblichen Kompensatoren. Hierbei ist es stets vorteilhaft mit stark geschlossener Aperturblende zu arbeiten. Auch spielt die Zentrierung des Pol-Drehtisches hier eine wichtige Rolle.

Es war der Firma ZEISS durchaus bekannt, dass ein nicht geringer Teil der verkauften Einrichtungen meist nur zur trivialen Erzeugung eines farbigen Phasenkontrastes benutzt wurde. Deshalb hieß die Einrichtung hausintern auch liebevoll nur „Jasmin Lebedeff“. Das hatte auf die Gebrauchsanleitung jedoch keinen Einfluss ausüben können. Aber immerhin wurde die Broschüre 41-540-d/e/f später mit schönen farbigen Abbildungen von der Diatomee *Stauroneis acuta*, bzw. lebenden Ganglienzellen versehen. Das haben dann Dr. Heinz Gundlach (CZO) und Prof. David (University of Denver/Colorado, USA) gemacht.

## Die kontrastoptimierte Justierung

Möchte man die Einrichtung Pol Int nicht für wissenschaftliche Messzwecke, sondern vorrangig zur farbigen Kontrastierung von transparenten Phasenobjekten (z.B. Protisten, kleine Invertebraten) einsetzen, empfiehlt es sich, die Justiervorschrift geringfügig zu modifizieren.

Hierbei wird besonderes Augenmerk auf die exakte Übereinstimmung der Lagebeziehungen von kondensorseitiger Strahlteiler- und objektivseitiger Strahlvereiniger-Platte in x-/y-, sowie z- Richtung gelegt. Dies ist mit einfachen Schritten reproduzierbar bei allen im Prinzip funktionstüchtigen Einrichtungen zu erreichen. Dann kann mit vollständig/ fast vollständig geöffneter Aperturblende dennoch ein hoher Bildkontrast bewirkt werden.

Dieser Justierweg erklärt nicht, wie man aus Einzelteilen zusammengestellte Einrichtungen „zum Laufen“ bekommen/ „tunen“ kann, oder was zu tun ist, wenn man die Pol Int-Objektive aus ihren werkseitig justierten Aufnahmen entnehmen muss, insbesondere zum Zwecke der Adaption an nicht ursprünglich bestimmungsgemäße Geräte. Hierzu hat ja Jürgen Boschert schon etwas geschrieben. Letztendlich handelt es sich hier um eine erneute Ausrichtung des Azimuts von Strahl-Teiler und Strahl-Vereiniger.

Andere, weitergehende denkbare Optimierungsschritte wären:

1. Eine geringfügige Änderung des Azimuts der Strahl-Teilers/ Lambda/2- Kombination im Kondensator gegenüber den Schwingungsrichtungen der Polare
2. Eine andere Einstellung der Plattenhöhe im Kondensator

Ich denke, das wurde auch schon alles ausprobiert.

Ich möchte auch jetzt nicht die relativ einfachen kristalloptischen Zusammenhänge erklären, die meinem Justierweg zu Grunde liegen. Das kann ich dann auf Wunsch noch nachliefern. Letztendlich geht es nur um die exakte Einhaltung aller Schwingungsrichtungen der durch die kristalloptischen Komponenten laufenden Teilstrahlen auch relativ zueinander.

Es gibt zur Theorie des Pol Int bereits mehrere gute Beschreibungen, die sich auch zum stillen Selbststudium eignen:

Durchlicht-Interferenz-Mikroskopie. CARL ZEISS Oberkochen/ Württ. 40-560-d (1961)

Piller, H.: Durchlicht-Interferenzmikroskopie nach dem JAMIN-LEBEDEFF-Prinzip. ZEISS Mitteilungen, 2. Bd./ 8. Heft Mai 1962, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Gahm, J.: Quantitative Messungen mit der Interferenzanordnung von Jamin-Lebedeff. ZEISS Mitteilungen, 3. Bd./ 1. Heft März 1963, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Es nicht nachteilig, die Gebrauchsanleitung G 41-540-d/e (entspricht G 41-560/I-d/e) zu kennen.

## Justierung Pol Int

### Vorbereitung:

Die Einrichtungen Pol Int wurden „im Behälter“ geliefert, dem berühmten Holzkasten. Es gab übrigens auch Kästchen/ „Einzelbehälter“ für einzelne Objektiv/ Kondensarpaare.

Die gelbbraunen Schutzfilze im Holzkasten waren mit einem elastischen Polyurethan-Schaum aufgeklebt. Der wird im Laufe der Zeit weich und brüchig. Als erstes nehme ich alle optischen Bauteile aus dem Holzkasten. Die Filze werden vorsichtig durch Abziehen entfernt. Der PU- Schaum wird soweit möglich zunächst abgesaugt/ mechanisch entfernt und mit den Fingern von Filz und Holz weggerubbelt. Danach erneutes Absaugen. Die Kästen wische ich anschließend mit Brennspiritus, nach Trocknung mit SIDOLIN aus. Die Filze können später mit einem geeigneten Kleber (z.B. aus der UHU- Familie) neu eingesetzt werden. Die hintere Linse der Objektive darf AUF KEINEN FALL manuell gereinigt werden. Die PU-Schaum-Partikel werden mit einem starken Staubsauger abgesaugt. Von MIELE gab es dazu für den Modellbau entwickelte kleine Düsenaufsätze. Die werden direkt an die Objektiv-Hinterblende gehalten. Damit bekommt man das alles gut weg. Die Objektive decke ich von hinten noch mit lose aufgelegten Staubschutz-Verschlusskappen für die Objektivrevolver-Augen ab.

Das Mikroskop sollte sauber sein. Ebenso das Händewaschen nicht vergessen. Bei Verwendung der Halogenlampen das Konversionsfilter 3200-5500 K oder das Kontrastfilter CB 6 benutzen. Für LED- Licht nehme ich erst einmal das Konversionsfilter 5700-3200 K, d=32 mm, 427809-9000-000.

### Der Ablauf:

#### 1. Orthogonale Auslöschlage von Polarisator- Analysator

Das Gerät ist zunächst noch mit einem konventionellen Objektivrevolver versehen. Den normalen Kondensator und ein Objektiv vom Mikroskop entfernen. Beobachtung der Auslöschung ohne Okular, Objektiv, Kondensator. Bei STANDARD- Geräten muß der Analysator-Zwischentubus exakt eingerastet sein. Einschalten des Analysatorschiebers. Es ist vorteilhaft, zunächst den Geräte-spezifischen festen Analysatorschieber einzusetzen (dessen Schwingungsrichtung N-S werkseitig **sehr** exakt eingestellt wurde). Ist dieser nicht vorhanden, stellt man zunächst den Polarisator auf Normallage  $0^\circ$  (W-O) und dreht dann den Analysator bis zur maximalen Auslöschung. Mit festem Analysator geht es umgekehrt, danach wird dann der Analysator drehbar eingesetzt und zur dann nicht mehr veränderten Polarisatorstellung gekreuzt.

Die Polare schwingen jetzt exakt W-O (Polarisator) und N-S (Analysator). Diese Einstellung wird nicht mehr verändert.

Bei sehr alten Geräten war die heute in der ISO- Norm festgelegte Schwingungsrichtung von Polarisator (W-O) und Analysator (N-S) vertauscht. Das ist aber nicht weiter wichtig.

## 2. Einstellung Mittenlage Kondensor- Strahlteiler

Ein konventionelles Pol- taugliches Normal- Hellfeldobjektiv (z.B. NEOFLUAR 16x, Plan 10x etc.) einschrauben. Keine zentrierbaren Objektive Pol verwenden! Pol Int Kondensor einsetzen.

Den Kondensor Pol Int nach Augenmass mittels der langen Einstellschraube für die Plattenkipfung so einstellen, das die Strahlteilerplatte zunächst horizontal sitzt. Man kann das auch vor Einsetzen des Kondensors Pol Int machen, indem man ein Deckglas auf die Kondensorfrontoptik legt und dieses horizontal einstellt (siehe auch Anmerkung zu Schritt 4):



Abb. 2

Die Platte im Pol Int Kondensor muss unter  $45^\circ$  zu den Schwingungsrichtungen von Polarisator und Analysator liegen:

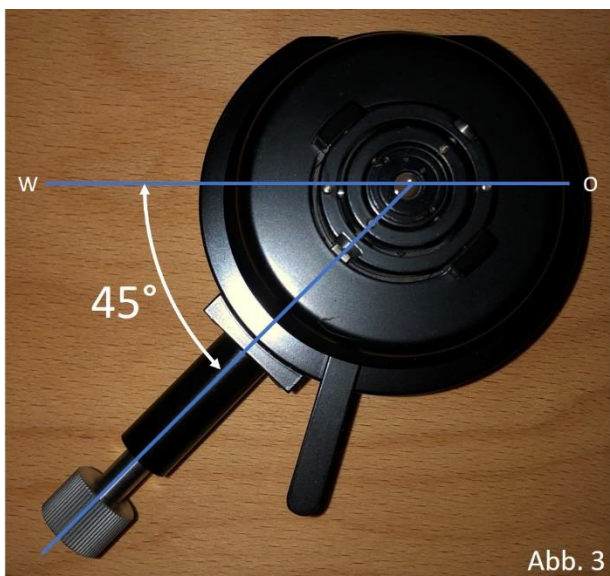


Abb. 3

Das ist werkseitig gegeben, wenn der Dorn in der Kondensor-Aufnahme in die Nut der Kondensor-Schwalbe fassen kann. Benutzt man aber z.B. eine „ältere“ Einrichtung Pol Int mit nach vorne gerichteter Nut in einer neueren Kondensoraufnahme (Dorn hinten), stellt man die Achse des Kondensordrehknopfes genau mittig über die Schraube der Kondensorzentrierung:



Vorteilhafterweise werden zunächst beide Polfilter ausgeschwenkt, wenn dies nicht geht (z.B. weil das einfache Pol-Filter auf die Lichtaustrittsöffnung gelegt wurde) nur einer der beiden. Sauberes Präparat auflegen, scharfstellen und auf eine weiträumig objektfreie Stelle fahren. Leuchtfeldblende mit den Kondensorzentrierschrauben exakt zentrieren (evtl. hierzu die Aperturblende weit schliessen).

Jetzt sitzt der Strahlteiler exakt mittig (in x-/y- Richtung).

#### **Anmerkung:**

Bei normalen Gebrauch entstehen beim Jamin- Lebedeff- Verfahren entsprechend der optischen Wirkungsweise des Systems mehrere Feldblenden-Bilder: Nebenbild, Hauptbild und ein ebenfalls rundes Vergleichsstrahl-Bild. Dies ist zunächst verwirrend. Man sollte sich deshalb damit vertraut machen, um diese drei Erscheinungen voneinander unterscheiden zu können. Das ist in der Gebrauchsanleitung G 40-560/I-d auf Seite 11 sehr gut erklärt. Dort wird auch empfohlen, zum besseren Verständnis einmal die Nebenbilder zu unterdrücken. Um das Leuchtfeldblenden- Nebenbild verschwinden zu lassen, wird einer der beiden Polare (z.B. Polarisator) ausgeschaltet und der verbleibende Polar (z.B. Analysator) aus seiner Normallage um  $135^\circ$  gedreht. Hilfreich hierbei ist auch, ein flaches, kleines Objekt im Bild zu haben (z.B. Folienschnipsel). Wenn man geübt ist, wird man das korrekte Hauptbild der Leuchtfeldblende von ihrem Nebenbild und dem Vergleichstrahlenbild sicher unterscheiden und damit immer eindeutig identifizieren können. Wichtig für die Lage des Feldblenden-Bildes beim Justieren ist auch, dass die Teilerplatte im Kondensor möglichst horizontal steht!

### 3. Einstellung Mittenlage Objektiv- Strahlvereiniger

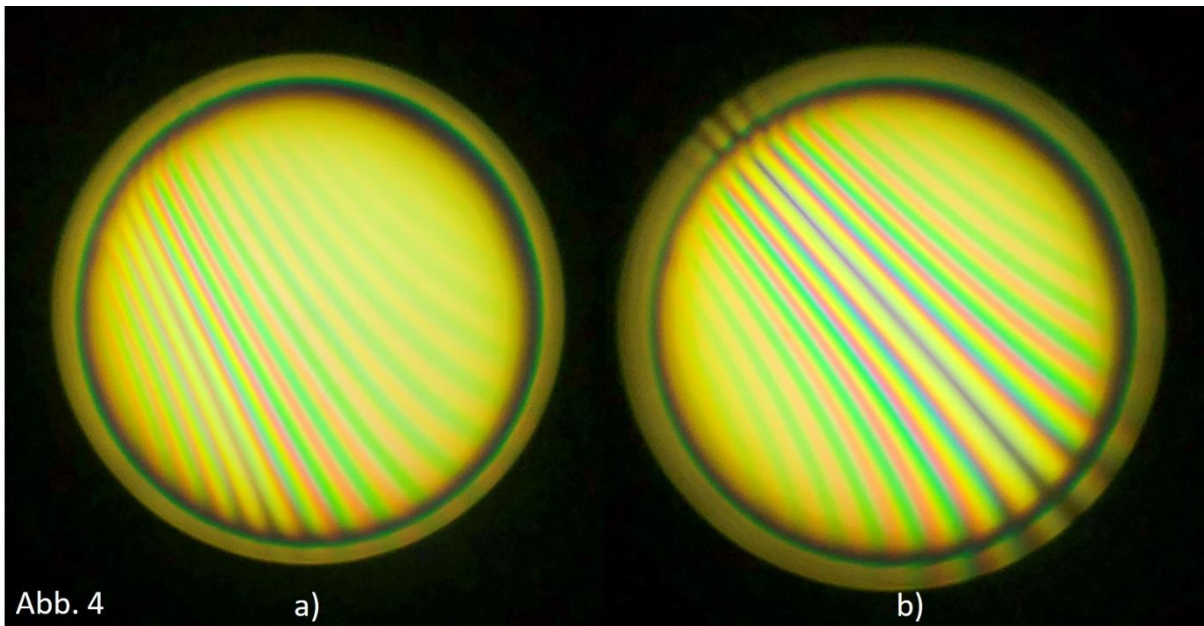
Einsetzen des passenden Objektivs Pol Int. Die Leuchtfeldblende in der vorherigen Mittenzentrierung belassen und nicht über die Kondensorzentrierung verstellen! Präparat scharfstellen. Leuchtfeldblende schließen. Leuchtfeldblende über die Justierschrauben an der Objektiv-Einzelaufnahme mittig justieren.

Jetzt sitzt die Strahlvereiniger-Platte exakt mittig zur Strahlteiler-Platte (in x-/y- Richtung).

### 4. Einstellung Azimut Strahlvereiniger zu Strahlteiler

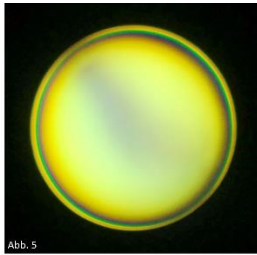
Beide Polare einschwenken. Probe scharf stellen. Auf eine Präparatstelle fahren, die viel freien Hintergrund hat.

Okular durch Hilfsmikroskop ersetzen/ Bertrandlinse Ph einschwenken und fokussieren. Dadurch wird Betrachtung der hinteren Brennebene des Objektivs möglich. Langsames Drehen der objektivseitigen Vereinigerplatte. In der hinteren Objektiv-Brennebene wird ein Interferenz-Streifensystem sichtbar (a). Diese Einstellung ist nicht immer schnell auffindbar und sehr empfindlich! Danach die Kondensor-Platte durch Drehen and der langen Schraube kippen, bis schwarzer Interferenzstreifen 0. Ordnung mittig in der Objektivpupille liegt (b).



Objektivseitige Vereinigerplatte drehen, bis die hintere Objektiv-Brennebene möglichst homogen Schwarz erscheint.

Das sieht dann in etwa so aus (es geht noch etwas homogener und dunkler als hier dargestellt):



Okular einsetzen. Probenstelle mit ausreichend leerem Hintergrund fokussieren. Besten Kontrast des Hintergrundes (jetzt Schwarz) durch iteratives, jeweils nur geringfügiges Drehen der Vereinigerplatte und Verkippen des Strahlteilers einstellen. Hierzu die Aperturblende schliessen.

Jetzt stimmt der Azimut beider Platten exakt zueinander.

#### **Anmerkungen:**

Mit einem schmalbandigen Interferenz-Grünfilter  $\lambda = 546 \text{ nm}$  (z.B. ZEISS, AHF) kann man manchmal die Stellung bester Sättigung einfacher erkennen.

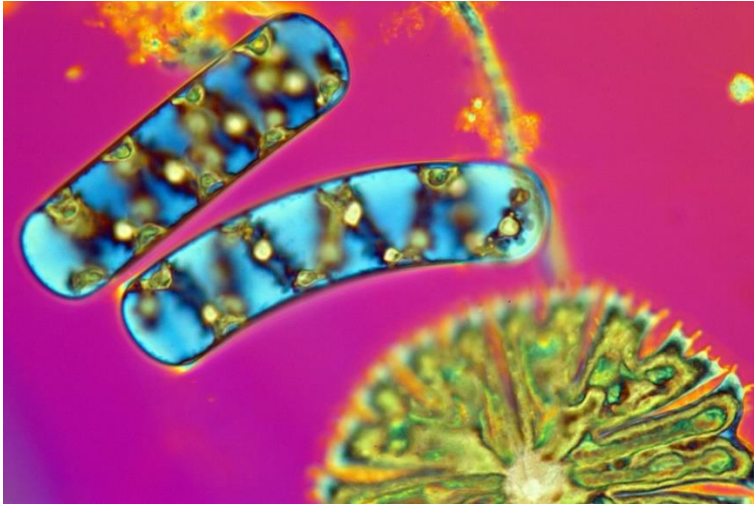
Läuft durch richtiges Einstellen der Strahlteiler-Platte der schwarze Interferenzstreifen genau durch die Pupillen-Diagonale, steht jetzt die Teilerplatte exakt horizontal. Dazu muss zuvor das Streifensystem durch Drehen der Vereiniger-Platte im Objektiv auch auf  $45^\circ$  gestellt worden sein. Man kann jetzt auch noch einmal erneut bei Schritt 2 anfangen!

#### **5. Einstellung der exakten Höhenlage der kondensorseitigen Strahteiler-Platte**

Geeignetes, sauberes „Übungs-Präparat“ (z.B. in hochbrechendes Einschlussmedium eingebettete Diatomeen- Legepräparate von Stefano Barone) fokussieren. Aperturblende öffnen. Kontrast sinkt dadurch merklich ab. Kondensorhöhe verstellen, bis Kontrast wieder maximal. Jetzt liegen die Kristallplatten exakt optisch zueinander konjugiert (in Z- Richtung).

Die Aperturblende nur geringfügig schliessen.

Wenn alles stimmt, sieht das Ergebnis so aus:



**Anmerkung:** Da Strahlteiler und Vereiniger nicht exakt in den optisch zueinander konjugierten Ebenen „vordere Kondensorbrennebe – hintere Objektivbrennebe“ angebracht wurden (sonst hätte die Bildfehlerkorrektur der Objektiv Pol Int gelitten), muss man für besten „Farbkontrast“ den Kondensator durch Höhenverstellung in die korrekte Lage bringen. Das entspricht einem Absenken des Kondensators.

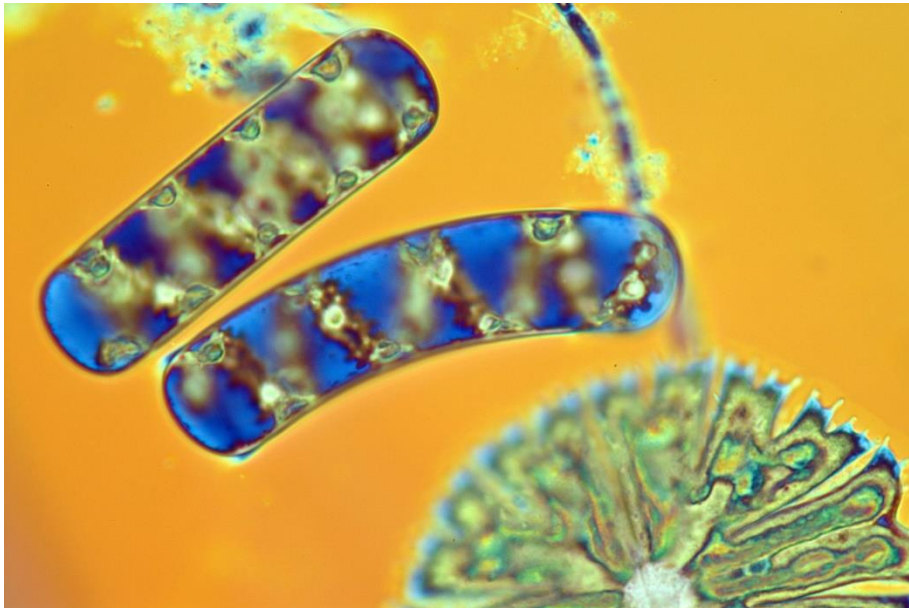
Man kann hier einwenden, dass das Kondensator-Absenken ja auch nur eine Aperturverringering bewirke. Im Unterschied zum reinen Schliessen der Aperturblende, bei der nur die stärker geneigten, höheraperturigen Strahlen abgeblendet werden, können jetzt aber größere kohärente Anteile des Beleuchtungslichtes aus der Teilerplatte und Probenlicht aus der Vereinigerplatte in der reellen Zwischenbildebene miteinander interferieren. Die Kontrastintensität steigt.

Zur Erzielung der braunen und blaugrauen Hintergrundfarben stellt man die nach dem oben beschriebenen Justierweg eingestellte Pol Int- Einrichtung von gekreuzten auf parallele Polare um. Dann wechselt die Farbabfolge von den bekannten Polarisations- Interferenzfarben gekreuzter Polare auf die paralleler Polare. Das finde ich am schönsten, da die Details hier oft besser erkennbar bleiben:



Voraussetzung für beste Bilddefinition auch hier wie immer: Keine sphärische Aberration!  
Also: Möglichst dünne Präparate, bzw. Objekte direkt an der Unterseite eines Deckglases  
 $D = 0,17 \pm 0,01$  mm. Damit die störenden Geisterbilder sich nicht mit dem Objektbild  
überlagern, darf die Probe nicht zu „dicht“ sein. Dann kann man durch einfache  
Tischdrehung die meisten Geisterbilder wegstellen.

Ich finde, das Pol Int II Achromat 40x/ 0,65 ist das beste Pol Int- Tümpeler- Objektiv.



Viel Spaß beim Mikroskopieren!

Michael

Ein pdf unserer Druckschriften kann vom ZEISS- Archiv gegen Entrichtung eines  
Unkostenbeitrags gerne zur Verfügung gestellt werden. Kontakt bitte per PN nur über mich.  
Die Anfragen zur Gebrauchsanleitung G 41-540-d/e (entspricht G 41-560/I-d/e) werden dann  
von mir gesammelt und nach Ablauf der vereinbarten Sammelfrist effizient bearbeitet.

Privatanschrift des Verfassers: Michael Zölffel, Mühlspielweg 10, 37077 Göttingen